



Avaliação de estrógenos nas águas destinadas ao abastecimento público na região do rio Paraíba do Sul, SP.

Juliana Ikebe Otomo¹, Elaine Arantes Jardim Martins², Renata Rodrigues de Souza³, Hélio Akira Furusawa⁴, Maria Aparecida Faustino Pires⁵

¹⁻⁵ Centro de Química e Meio Ambiente/ IPEN-CNEN/SP (juliana_ik@yahoo.com.br)

Resumo

Os disruptores endócrinos pertencem à classe de poluentes, que mesmo em baixíssimas concentrações causam efeitos adversos aos organismos a eles expostos, principalmente por serem capazes de interferir no sistema endócrino de seres humanos e animais. Os estrógenos destacam-se por serem compostos potencialmente ativos no sistema biológico e estão relacionados à origem de diversos tipos de cânceres, pois têm melhor conformação com os receptores hormonais e são continuamente introduzidos no ambiente. O estudo teve por objetivo desenvolver e validar metodologia para determinar os estrógenos estrona, estradiol e etinilestradiol em amostras de água bruta e tratada da região da Bacia Hidrográfica do Rio Paraíba do Sul. A população atendida pelas unidades da SABESP da região estudada é da ordem de um milhão e duzentos mil. Embora a água distribuída seja de excelente qualidade, foram constatadas baixas concentrações de estrógenos nas amostras de água bruta em alguns pontos, o que indica pequenos sinais de contaminação. Este projeto de pesquisa está vinculado a uma parceria IPEN/SABESP.

Palavras-chave: Estrógenos. Validação de metodologia. Rio Paraíba do Sul.

Área Temática: Recursos Hídricos.

Abstract

Endocrine disruptors belong to the class of pollutants, which even at very low concentrations may cause adverse effects to organisms exposed to them, mainly because can affect the endocrine system of humans and animals. Estrogens are noted by being potentially active compounds in biological systems and are related to the origin of several types of cancers, because have better conformation with hormone receptors and are continuously introduced into the environment. The study focused on to develop and validate methodology to determine the estrogens estrone, estradiol and ethinyl estradiol in samples of water in the region of the basin of the Paraíba do Sul. The population served by the units of SABESP the study area is around one million two hundred thousand. Although the water supplied is of excellent quality, it was observed low concentrations of estrogens in samples of surface water at some points, indicating signs of trace contamination. This research project is a partnership IPEN / SABESP.

Key words: Estrogens. Chromatography. Validation.

Theme Area: Water resources.

1 Introdução

A água é um recurso natural disponível em diversas formas sendo uma das substâncias mais abundantes na natureza. Comumente encontrado na forma líquida, a água se renova por meio do ciclo hidrológico. A atividade humana requer múltiplos usos deste recurso, seja para abastecimento público, industrial, agrícola ou para geração de energia. É fundamental que os recursos hídricos apresentem condições físicas e químicas adequadas, assim como também é necessário que ela se encontre em disponibilidade suficiente e qualidade satisfatória para



suprir as necessidades dos seus usuários. Entretanto, o modelo de desenvolvimento adotado pelo homem nas últimas décadas, passou a contribuir de modo negativo para a alteração na disponibilidade de água (BRAGA, 2002; GHISELLI, 2007).

O tema qualidade da água tem recebido atenção maior nos últimos anos devido a uma classe de substâncias que podem produzir efeitos adversos aos organismos expostos mesmo em concentrações muito baixas, $\mu\text{g.L}^{-1}$ e ng.L^{-1} , os chamados micropoluentes. Nesta classe de poluentes encontram-se os fármacos, disruptores endócrinos e poluentes orgânicos persistentes (POPs) (BILA, 2007; GIROTTO, 2007; GHISELLI, 2007).

Estudos realizados em diversos países (SERVOS, 2005; KATSOYIANNIS, 2005), relataram a presença destes micropoluentes em esgoto doméstico e efluentes de estação de tratamento de esgoto (ETE), este último relacionado à ausência ou a ineficiência do tratamento de esgoto pelas ETEs (GIROTTO, 2007; BILA, 2007; REIS FILHO, 2006).

Dentre os micropoluentes, existe um grande interesse no grupo de substâncias que podem interferir no sistema endócrino de seres humanos e animais, são os chamados disruptores endócrinos. Possuem estruturas distintas, incluindo hormônios sintéticos e naturais, substâncias naturais e uma grande quantidade de substâncias sintéticas (produtos farmacêuticos, produtos de higiene pessoal, agrotóxicos, antioxidantes, plásticos, produtos industrializados, tensoativos entre outros) que são amplamente utilizados pela sociedade moderna (GHISELLI, 2007).

Segundo a definição da USEPA (“United States Environmental Protection Agency”), “disruptores endócrinos são agentes exógenos que interferem na síntese, secreção, transporte, recepção, ação, ou eliminação dos hormônios naturais do corpo, os quais são responsáveis pela manutenção da homeostase (preservação da constância interna), reprodução, desenvolvimento e comportamento”. Sua ação se dá através do bloqueio, mimetização, estimulação, ou inibição da produção dos hormônios naturais. (USEPA, 1998; REIS FILHO, 2006; GHISELLI, 2007).

Na figura 1 pode-se observar uma representação da ação dos disruptores endócrinos no organismo.

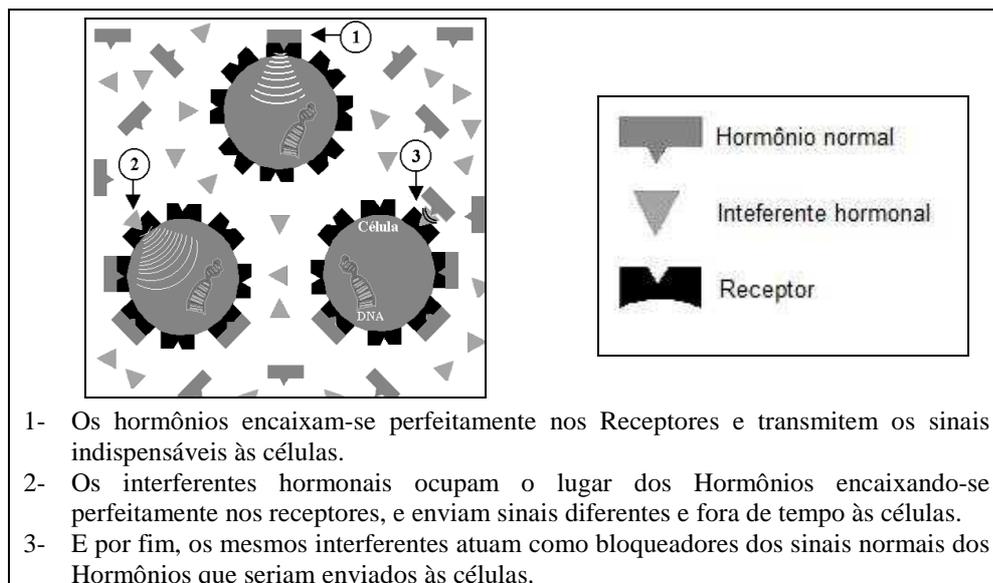


Figura 1 – Modo de ação dos disruptores endócrinos (interferentes hormonais)

Fonte: modificado de ACPO (2010)

Diversas organizações mundiais (UKEA: Agência Ambiental do Reino Unido; USEPA: Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos; OSPAR: Comissão de Paris e Oslo; JEA: Agência Ambiental do Japão; WWF: Organização não Governamental) têm



classificado várias substâncias químicas como interferentes endócrinos, em especial a União Européia elaborou um relatório contendo uma vasta lista de substâncias suspeitas de interferir no sistema endócrino, tanto de seres humanos como de diferentes espécies animais, e identificaram 118 substâncias, dentre estas, 12 foram designadas prioritárias para a condução de estudos mais detalhados (GIROTTO, 2007; GHISELLI, 2007). As substâncias alvo deste trabalho estão entre as últimas 12, são os estrógenos naturais 17β -estradiol e estrona e o sintético 17α -etinilestradiol.

Os estrógenos merecem destaque por serem compostos potencialmente ativos no sistema biológico e estão relacionados à origem de diversos tipos de cânceres, pois têm melhor conformação com os receptores, resultando em respostas máximas e são continuamente introduzidos no ambiente (REIS FILHO, 2006). O principal caminho de entrada dessas substâncias no ambiente é feita através da excreção humana, urina e em menor proporção pelas fezes, que seguem pela rede coletora de esgoto atingindo os ambientes aquáticos (GIROTTO, 2007; GHISELLI, 2007; BILA, 2007; REIS FILHO, 2006).

A Bacia Hidrográfica do Rio Paraíba do Sul foi escolhida como área de estudo por ser fortemente urbanizada e industrializada e estar dentro de um território quase completamente antrópico, com a Mata Atlântica original restrita a parques e reservas florestais. Além da parceria entre o IPEN e a SABESP que visa conhecer o comportamento dos disruptores endócrinos no sistema hídrico e nos processos de tratamento de águas e esgotos. Foram estudadas amostras de água bruta e tratada das ETAs (estações de Tratamento de água) de São José dos Campos, Guararema, Pindamonhangaba e Taubaté.

Localizada na Região Nordeste do estado de São Paulo, a bacia do rio Paraíba do Sul possui uma área de aproximadamente 55.000 km². Essa bacia drena uma das regiões mais desenvolvidas do país, abrangendo parte do Estado de São Paulo, na região conhecida como Vale do Paraíba Paulista, parte do Estado de Minas Gerais, denominada Zona da Mata Mineira, e metade do Estado do Rio de Janeiro. Em toda sua extensão há atualmente 180 municípios, 36 dos quais estão parcialmente inseridos na bacia. O rio Paraíba do Sul resulta da confluência dos rios Paraíba e Paraitinga no estado de São Paulo, a 1.800 metros de altitude e percorre 1.150 km até desaguar no norte fluminense, no município de São João da Barra (COPPETEC, 2006).

Nesse contexto, o objetivo deste trabalho é apresentar metodologia desenvolvida e validada para a determinação dos estrogênios estrona, estradiol e etinilestradiol, utilizando a cromatografia gasosa acoplada a um detector por espectrometria de massas (*GC/MS*).

Porém, é praticamente impossível gerar resultados totalmente livre de erros e incertezas, visto que em cada operação que constitui a análise química há uma incerteza associada. Dessa forma, para garantir informações seguras e confiáveis é realizada uma avaliação denominada validação de ensaio químico (ICH, 1994). A fim de assegurar a qualidade das medidas instrumentais e a confiabilidade estatística dos cálculos envolvidos no seu processamento devem ser respeitados alguns parâmetros básicos. A estimativa desses parâmetros pode variar de acordo com a técnica analítica empregada ou com o nível de resultados que se pretende gerar.

Os parâmetros avaliados na validação desta metodologia foram: seletividade, linearidade, sensibilidade do método, limites de detecção (LD) e quantificação (LQ), faixa de trabalho, recuperação, precisão, exatidão e robustez, todos de acordo com o procedimento DOQ-CGCRE-008 de 01/03/2003 do INMETRO.

2 Metodologia

Para a caracterização dos compostos foram coletadas 2 tipos de amostras (água bruta e água tratada) de 4 municípios pertencentes a região da Bacia Hidrográfica do Rio Paraíba do Sul: São José dos Campos, Taubaté, Pindamonhangaba e Guararema. As amostras foram



coletadas e preservadas de acordo com o procedimento estabelecido pela CETESB, em frasco de vidro âmbar de 1 litro e mantidas em temperatura de aproximadamente 4°C (CETESB, 1987).

Na maioria das análises que envolvem amostras ambientais é necessário fazer uma concentração substancial do analito para se isolar os compostos alvos da matriz e atingir os limites de detecção e quantificação requeridos. Um procedimento analítico típico inclui, portanto, vários passos para preparação da amostra, tais como filtração, extração, purificação e evaporação (REIS FILHO, 2006).

As amostras coletadas foram filtradas em sistema de filtração a vácuo com membrana de 0,45µm, para remoção de sólidos suspensos. Após a filtração, a amostra foi acidificada com ácido clorídrico a pH 3.

A concentração dos compostos estudados foi realizada por extração em fase sólida, utilizando-se colunas SPE ENVITM-18. Após a percolação da amostra, os cartuchos foram levados para centrífuga (por 30 minutos a 2500 rpm) para a remoção completa da água existente no material adsorvente. Na eluição foram utilizados 5 mL da mistura Diclorometano e Metanol (DCM:MeOH na proporção 40:60) e o eluato foi evaporado em fluxo suave de N₂ até 1 mL para posterior injeção no GC/MS.

O monitoramento dos compostos foi realizado no modo SIM, utilizando 5 fragmentos da relação massa/carga para cada um dos elementos, descritas na tabela 1.

Tabela 1 – Relação massa/carga dos compostos avaliados no modo SIM

Composto	Número CAS	Tempo de retenção	m/z 1	m/z 2	m/z 3	m/z 4	m/z 5
Estrona	53-16-7	22,5	146	213	270	271	272
Estradiol	50-28-2	23,0	172	213	272	273	274
Etinilestradiol	57-63-6	24,6	213	228	296	297	298

O equipamento utilizado neste estudo foi um Cromatógrafo a gás, *Shimadzu* GC-17Ai, acoplado ao detector de espectrometria de massas, *Shimadzu* - QP5000. Embora já exista no mercado equipamento mais sensível, a grande maioria dos laboratórios ainda conta com instrumentos antigos os quais não precisam ser abandonados, bastando apenas que sejam adequadas metodologias para uso dos mesmos a fim de se poder atingir a sensibilidade necessária.

Os reagentes e solventes utilizados são de grau analítico, cromatográfico ou compatível. Para a confecção das curvas de calibração e desenvolvimento da metodologia foram utilizados padrões analíticos (dos compostos: Estrona, Estradiol e Etinilestradiol), com certificado de pureza de procedência *Aldrich Chemical Co.*

Na validação da metodologia para avaliação da seletividade, especificidade, faixa de trabalho e linearidade, foram realizadas análises em sete replicatas com e sem matriz, alguns experimentos em um mesmo dia e outros em dias diferentes. Com os dados obtidos foi avaliada a homogeneidade, pelo teste F e teste T, calculando-se a variância de cada uma das replicatas. A precisão e exatidão foram avaliadas pelo Z-score. Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram avaliados segundo o documento DOQ-CGCRE-008 de 01/03/2003 do INMETRO. A robustez foi determinada aplicando-se o teste que consiste no planejamento fatorial de 7 variáveis com 8 experimentos (planejamento fracionário saturado) de acordo com a metodologia proposta por Vander Heyden (2001). Para os cálculos utilizou-se a planilha elaborada por Furusawa (2007) a qual segue o procedimento INMETRO citado.

3 Resultados

A seletividade e especificidade da metodologia desenvolvida foram avaliadas pela observação do cromatograma, onde foi possível identificar cada um dos compostos, seus



respectivos tempos de retenção e a excelente separação dos mesmos durante a corrida cromatográfica. Na figura 2 pode ser observada a separação e identificação de todos os compostos estudados, referente à concentração de aproximadamente $0,4\mu\text{g.mL}^{-1}$.

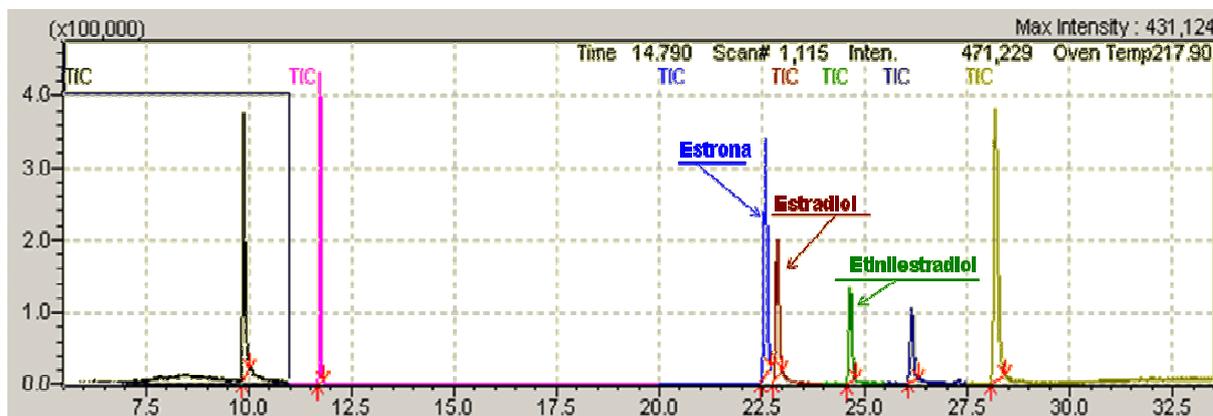


Figura 2 – Cromatograma de padrão misto de hormônios obtido em modo SIM, com identificação dos compostos estudados (estrona, estradiol e etinilestradiol)

Os compostos estudados apresentaram curvas analíticas com os coeficientes de correlação (r^2) muito bons (tabela 2), comprovando que a linearidade das curvas analíticas nos intervalos escolhidos está dentro do recomendado.

Tabela 2 – Coeficiente de determinação para os compostos estrona, estradiol e etinilestradiol em matrizes de água bruta e de água tratada

Composto	r^2 para AB	r^2 para AT
Estrona	0,999	0,999
Estradiol	0,999	0,999
Etinilestradiol	0,998	0,999

Nos resultados para o teste estatístico aplicado para avaliação da homogeneidade das variâncias, teste F (*Snedecor*), nas medidas de adição padrão em dois grupos de soluções, sendo um somente com os solventes e o outro com a matriz, para $n = 7$ e 95% de confiança, comparados com o valor crítico, $F_{6,6, 95\%} = 4,28$, foi possível observar que para a maioria dos compostos, a matriz interfere consistentemente na precisão das medidas considerando o intervalo de concentrações deste estudo. O efeito das matrizes foi avaliado também pelo teste de significância das diferenças das médias, (teste t - *Student*), dos dois conjuntos de amostras (solvente e matriz). Os resultados do teste t (*Student*) igualmente foram comparados ao valor crítico, $t_{12, 95\%} = 2,179$, sendo que para valores abaixo desse valor crítico, considera-se que as médias não apresentam diferenças significativas. Os ensaios indicaram existir diferenças entre as condições (adição no solvente e adição na matriz) para todas as concentrações avaliadas. Essa avaliação evidencia que resultados obtidos contra uma curva analítica preparada somente com os solventes serão diferentes de uma curva preparada com uma matriz igual ou semelhante à amostra. Na metodologia desenvolvida como não há matriz certificada para os elementos estudados, as determinações foram realizadas a partir da adição de padrões a uma amostra de referência de acordo com o procedimento INMETRO.

Os limites de detecção e de quantificação da técnica e do método respectivamente são apresentados na tabela 3, com 95% de confiança (distribuição unilateral).



Tabela 3 – Limites de detecção e de quantificação da metodologia desenvolvida e do método aplicado para amostras de 1L para os compostos estrona, estradiol e etinilestradiol

Composto	LQ do método para amostra de 1L	LQ do método para amostra de 2L	Limites da Técnica	
	LQ ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	LQ ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	LQ ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	LD ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)
Estrona	0,540	0,27	0,540	0,04
Estradiol	0,589	0,29	0,589	0,09
Etinilestradiol	0,565	0,28	0,565	0,06

Os compostos aqui estudados não são contemplados na legislação. Porém, segundo o CONAMA (BRASIL, 2005), para a maioria dos compostos orgânicos, os limites permitidos pela legislação são de $0,018 \mu\text{g.L}^{-1}$ e $0,05 \mu\text{g.L}^{-1}$ para águas doces classe 1 e classe 2, dependendo de seu uso e $0,70 \mu\text{g.L}^{-1}$ para águas doces classe 3.

Quanto à exatidão, os resultados da análise de variância para os compostos estudados indicam que as variações foram explicadas satisfatoriamente pelos modelos lineares adotados, representados pelas equações da reta ($y = ax + b$) dos respectivos compostos.

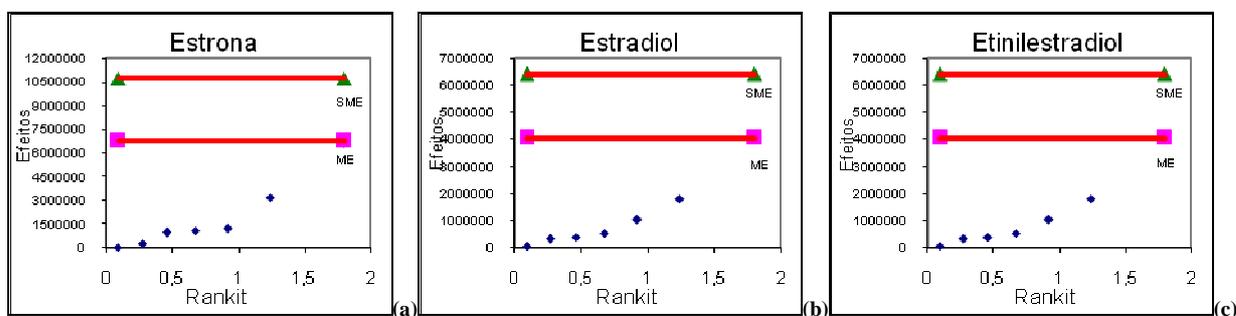
De acordo com o índice *z score*, os resultados dos testes para os compostos foram $|z| < 2$, podendo ser considerados satisfatórios na faixa de concentração avaliada.

A fim de verificar a sensibilidade do método analítico por efeito de pequenas variações, conforme os parâmetros selecionados na tabela 4 foram realizados cálculos de robustez pelo planejamento fatorial de 7 variáveis com 8 experimentos (planejamento fracionário saturado) de acordo com a metodologia proposta por Vander Heyden (2001), baseado no documento DOQ-CGCRE-008 do INMETRO. Utilizou-se como ferramenta a planilha “Validação de Ensaio Químicos” (FURUSAWA, 2007) onde os parâmetros são avaliados pela estimativa do erro da distribuição dos efeitos utilizando-se o algoritmo de Dong (pequenos experimentos).

Tabela 4 – Parâmetros selecionados para os testes de robustez

Fator	% Solventes da eluição	pH da amostra	T (°C) injetor	T (°C) interface	Fluxo total (mL.min^{-1})	Fluxo coluna (mL.min^{-1})	Voltagem detector (kV)
Nominal	60 _{DCM} :40 _{MeOH}	3	265	270	28	1,6	2,5
Varição	40 _{DCM} :60 _{MeOH}	Original	240	250	35	2	2,2

Os resultados obtidos, apresentados na figura 3, mostram que de acordo com o gráfico *Rankit*, os efeitos proporcionados por pequenas variações na metodologia não afetam de forma significativa os resultados, visto que os valores obtidos encontram-se abaixo da margem de erro (ME) e bem abaixo da margem de erro superior (SME).

Figura 3 – Gráficos *Rankit* dos efeitos proporcionados por pequenas variações na metodologia, respectivamente para: (a) Estrona; (b) Estradiol e (c) Etinilestradiol.



Já na representação gráfica dos efeitos de cada parâmetro na robustez do método, figura 4, para todos os compostos presentes nas amostras, o fator de grande influência positiva é a voltagem do detector, e observa-se que o fator de maior influência negativa é o fluxo na coluna, seguido da porcentagem dos solventes na eluição para extração no SPE.

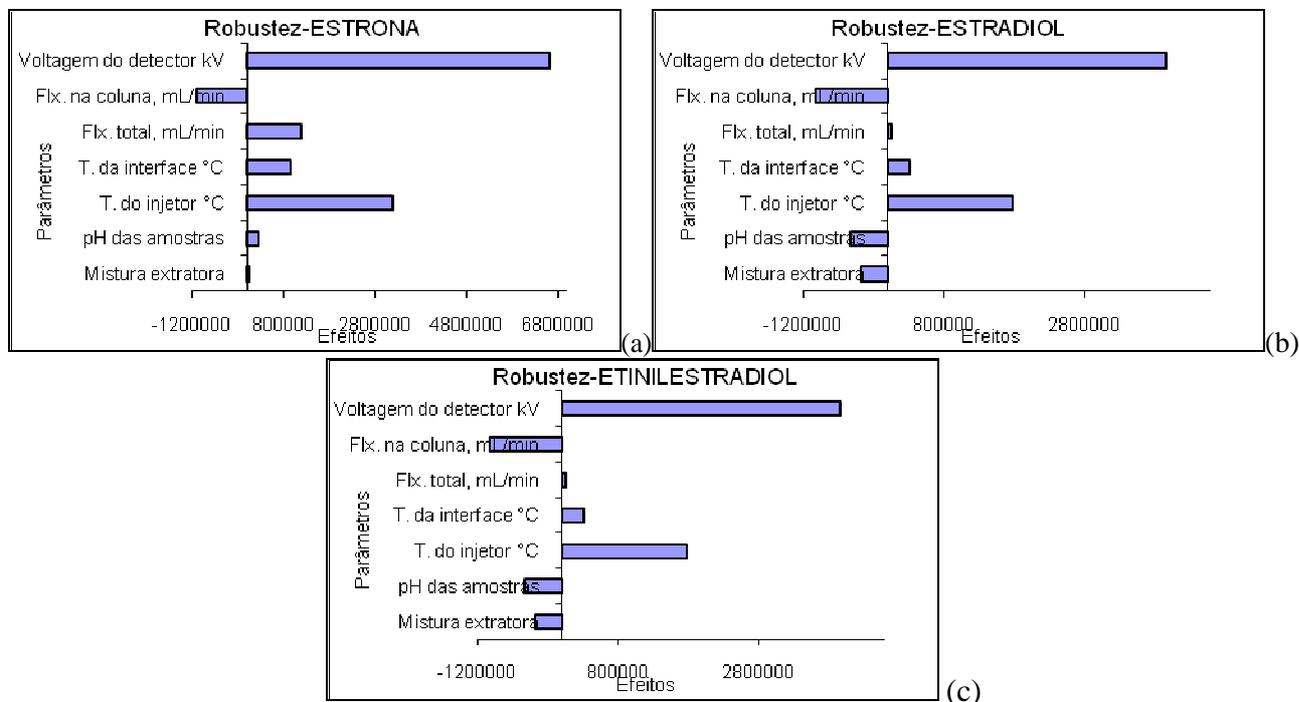


Figura 4 – Representação gráfica dos efeitos de cada parâmetro na robustez do método respectivamente para: (a) Estrona; (b) Estradiol.

Na tabela 5 são apresentados os resultados das análises das amostras coletadas durante a 1ª coleta (15/04/2009) e a 2ª coleta (27/08/2009). Os valores são referentes às médias de 3 resultados mais ou menos o valor das incertezas associadas.

Tabela 5 – Resultados da análise dos disruptores nas amostras (1L) de água bruta (AB) e tratada (AT) da região do rio Paraíba do Sul (P: Pindamonhangaba; T: Taubaté; SJC: S.José dos Campos e G: Guararema).

Amostra	1ª Coleta - 15/04/2009			2ª Coleta - 27/08/2009		
	Estrona	Estradiol	Etinilestradiol	Estrona	Estradiol	Etinilestradiol
<i>Limites de Quantificação</i>	LQ = 0,54	LQ = 0,59	LQ = 0,56	LQ = 0,54	LQ = 0,59	LQ = 0,56
Água tratada - concentração em $\mu\text{g.L}^{-1}$ na amostra de 1L						
ATP	-	-	-	-	-	<0,56
ATT	-	-	-	-	-	<0,56
ATSJC	-	-	-	-	-	<0,56
ATG	-	-	-	-	-	<0,56
Água bruta - concentração em $\mu\text{g.L}^{-1}$ na amostra de 1L						
ABP	<0,54	<0,59	<0,56	0,56	1,12	<0,56
ABT	<0,54	<0,59	<0,56	<0,54	0,63	<0,56
ABSJC	<0,54	<0,59	<0,56	<0,54	0,93	<0,56
ABG	<0,54	<0,59	<0,56	<0,54	<0,59	<0,56

Os resultados obtidos, mostram que apesar de a água bruta apresentar traços de contaminação dos compostos estudados que podem ser pontuais ou não, a água distribuída ainda é de excelente qualidade. Porém o monitoramento desta região deverá continuar a fim de se avaliar a saúde dos corpos hídricos e da água distribuída, quanto à presença dos compostos estudados.

Os resultados abaixo do limite ficaram muito próximos dos limites de detecção e



devido à forte interferência da matriz, principalmente de água bruta, sempre que houve a possibilidade da ocorrência de um valor falso negativo ou falso positivo, foram realizadas adições padrão a fim de confirmar os valores.

4 Conclusões

A metodologia desenvolvida se mostrou adequada para a identificação e quantificação dos compostos estrógenos, sendo uma opção para controle da qualidade das águas. Os compostos estudados apresentaram boa recuperação e robustez do método.

Por meio da aplicação do método desenvolvido nas amostras de água bruta e tratada coletadas nas 4 ETAs foi possível verificar que embora a área se encontre preservada e a água distribuída seja de excelente qualidade, já se notam pequenos sinais de contaminação nas amostras de água bruta.

Este trabalho de pesquisa é de suma importância, pois além de realizar o diagnóstico ambiental da Bacia Hidrográfica do Rio Paraíba do Sul, no que se refere a alguns disruptores endócrinos, visa auxiliar o plano de gestão de recursos hídricos da região. Os resultados obtidos contribuem para o entendimento do nível de contaminação dos recursos hídricos estaduais e fornecem subsídios aos órgãos governamentais para a reavaliação da legislação vigente. Deverão ser realizadas coletas em intervalos mais curtos para que se possa fazer um monitoramento mais preciso, visto que algumas amostras apresentaram resultados positivos.

5 Referências

- BILA, D. M.; DEZOTTI, M. “Desreguladores endócrinos no meio ambiente: efeitos e consequências”. **Quím. Nova**, v. 30, nº 3 (2007), 651-666.
- BRAGA, B. et al. Introdução à Engenharia Ambiental. 1 ed. São Paulo: Prentice Hall, 2002.
- BRASIL. Ministério do desenvolvimento urbano e meio ambiente. Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA). **Resolução n. 357**, D.O.U., de 17/03/05, Brasília.
- CETESB – Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. **Guia de coleta e preservação de amostras de água**. 1987.
- COPPETEC. Assoc. Pró-Gestão das águas da Bacia Hidr. do rio Paraíba do Sul – AGEVAP. **Diagnóstico dos recursos hídricos** - Relatório final, 2006.
- FURUSAWA, H.A. **Validação de Ensaio Químicos**. São Paulo, IPEN-CNEN/SP, 2008 (adaptação eletrônica baseada no documento DOQ-CGCRE-008 de 01/03/2003 do INMETRO).
- GHISELLI, G. e JARDIM, W.F. Interferentes endócrinos no ambiente. **Quím. Nova**. v.30, nº3, p. 695-706, 2007.
- GIROTTO, G. et al. “Estrógenos em água: otimização da extração em fase sólida utilizando ferramentas quimiométricas.” **Ecl. Quím.**, v. 32, nº 2 (2007), 61-68.
- ICH – International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceutical for Human Use. **Validation of analytical procedures: Text and methodology Q2(R1)**. Oct. 1994.
- KATSOYIANNIS, A.; SAMARA, C. “Persistent organic pollutants (POPs) in the conventional activated sludge treatment process: fate and mass balance”. **Environ. Research** v. 97 (2005), 245-257.
- REIS FILHO; R. W.; ARAÚJO, J. C.; VIEIRA, E. M. “Hormônios sexuais estrógenos: contaminantes bioativos”. **Quím. Nova**. v.29, nº.4, São Paulo July/Aug., 2006
- SERVOS, R. M. et al. “Distribution of estrogens, 17 β -estradiol and estrone, in Canadian municipal wastewater treatment plants”. **Science of Tot. Environ.**, v. 336 (2005) 155-170.
- USEPA-United States Environmental Protection Agency; **Research Plan for Endocrine Disruptors**, Washington, 1998.
- VANDER HEYDEN, Y. et al. Guidance for robustness/ruggedness tests in method validation. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, 24, 2001.